泽蛙雌核单倍体几种同工酶基因表达的研究

吴 仲 庆

（厦门水产学院养殖系）

摘　要

本研究用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳，比较泽蛙雌核生殖单倍体和泽蛙二倍体在鳃盖闭合期的乳酸脱氢酶同工酶（LDH）、苹果酸脱氢酶同工酶（MDH）、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶(G-6-PDH)和酯酶同工酶（EST）的表型。实验表明，单倍体的上述同工酶区带数和活力与同胚期的二倍体比较，差异甚大。由此，作者认为，泽蛙单倍体同工酶基因的表达异常是由于缺少另一套染色体基因的相互作用。

关键词： 泽蛙，雌核单倍体，同工酶，基因

蛙类单倍体的基因表达，前人已作过一些猜测（Fankhauser, 1945; Moore, 1955），但是，迄今尚缺乏直接证据。为了研究单套染色体组下的基因关系和基因表达，我们在过去工作的基础上（吴仲庆，1983、1984、1985、1988），采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳，比较了同一母本所产生的泽蛙雌核生殖单倍体与二倍体的乳酸脱氢酶的同工酶（LDH）、苹果酸脱氢酶同工酶（MDH）、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶（G-6-PDH）和酯酶同工酶（EST），力图说明泽蛙雌核生殖单倍体几种常见同工酶基因的表达。

材 料 和 方 法

1.材料：以厦门的泽蛙（*Rana limnochris*）和黑眶蟾蜍（*Bufo melanostictus*）为材料，按我们过去的方法（丁汉波等，1965；吴仲庆，1983），由同一母本产生泽蛙雌核单倍体和泽蛙二倍体。

2.电泳样品的制备：将鳃盖闭合期的泽蛙单倍体和同胚期的泽蛙二倍体分别移至pH7.1的0.1*M*磷酸缓冲溶液中洗2分钟后，移至吸水纸，除去身上多余的水份，逐个移入1ml的玻璃匀浆器，按每10个幼体加入pH7.1的磷酸缓冲液0.5ml，匀浆，于－4℃冷冻5分钟后，在12,000转/分的高速台式离心机中离心15分钟，取上清液贮于－4℃，于16小时内作电泳分析。电泳前将该样品解冻后与0.025%溴酚蓝甘油按4:1的比例混合，

本文1988年7月18日收到，1989年8月23日修回。

作为电泳的分析样品。这样制作的样品分别代表同胚期二倍体与单倍体的个体水平。

3.电泳：采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板连续系统，电泳缓冲液为pH8.3的Tris-Gly缓冲体系，选用北京六一仪器厂生产的多用电泳槽和DYY-Ⅱ电泳仪，凝胶浓度为7.5%，交联度2.6%，胶板厚度1.5mm，电泳加样40μl，单倍体和二倍体样品均在同一块板上并列电泳，电压为200V，稳压电泳4小时，以冰水混合物挂槽冷却。

4.染色：检测乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和酯酶同工酶的步骤，按北京大学生物系遗传学教研室（1983）的方法，配制所需的染色液并染色。

结 果

1.乳酸脱氢酶的同工酶：图1是泽蛙单倍体（N）和泽蛙二倍体(2N)的LDH同工酶酶谱及线条图，由图1知道，泽蛙单倍体在鳃盖闭合期的酶带数目与二倍体一样，均出现三条区带，但都弱于二倍体的相应条带，比较见表1。

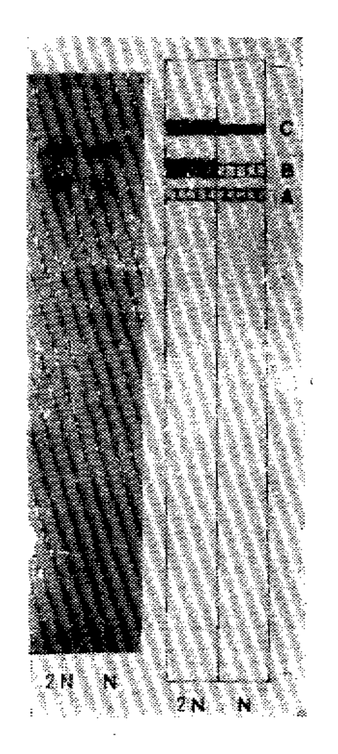


图1 LDH 同工酶酶谱
2N为二倍体 N为单倍体

表1 泽蛙单倍体和二倍体几种同工酶电泳酶谱的比较*

酶带 \ 酶活比较 \ 同工酶		LDH		G-6-PDH		MDH		EST	
		2N	N	2N	N	2N	N	2N	N
正极	A	++	+	+		++		++	+++
↓	B	++++	++		+++		+++	+	++
	C	++++	+++		+++		+++	++	
	D				++	+	+++		
	E						+++		
负极	F						++		

*2N为二倍体，N为单倍体。

2.葡萄糖-6-磷酸脱氢酶：图2是泽蛙单倍体和二倍体G-6-PDH同工酶酶谱及线条图，由图2知道，泽蛙二倍体在本实验条件下只有一条弱带A，单倍体则完全缺少这条酶带，而多出另外三条酶带B、C、D。各酶带相对酶活比较见表1。

3.苹果酸脱氢酶：图3是泽蛙单倍体和二倍体的MDH同工酶酶谱及线条图，由图3知道，泽蛙二倍体在鳃盖闭合期具有A、E两条酶带，而单倍体则具有B、C、D、E、F、G六条酶带，其中E带的酶活强于二倍体的同一条带，但B、C、D、F、G五条酶带皆为二倍体所没有。各酶带的强弱列于表1。

4.酯酶：图4是泽蛙单倍体和二倍体的EST同工酶酶谱及线条图，由图4知道，泽蛙二倍体在鳃盖闭合期可检测出A、B、C三条酶带，而单倍体只具有A、B两条酶带，缺少C带，但A、B带的酶活都比二倍体强。各酶带强弱比较于表1。

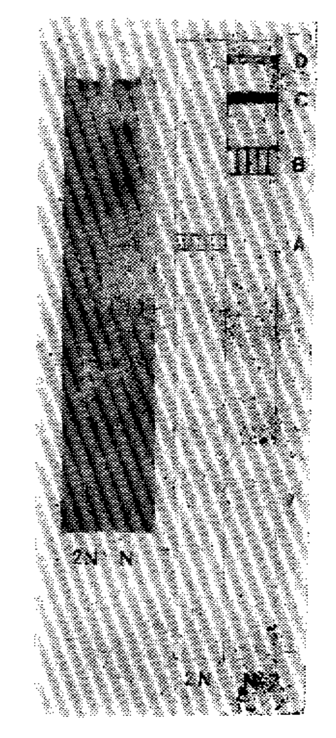


图 2　G-6-PDH同工酶
2N为二倍体　N为单倍体

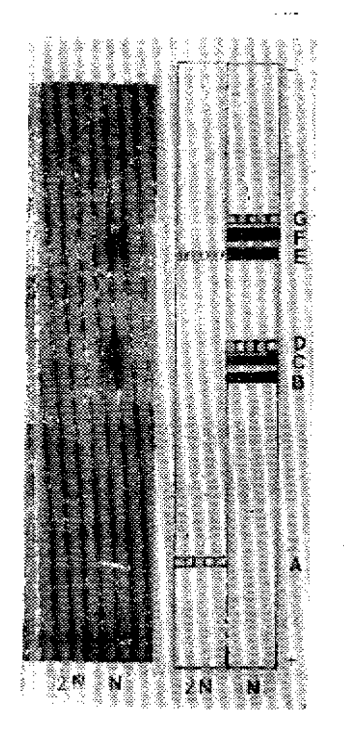


图 3　MDH同工酶酶谱
2N为二倍体　N为单倍体

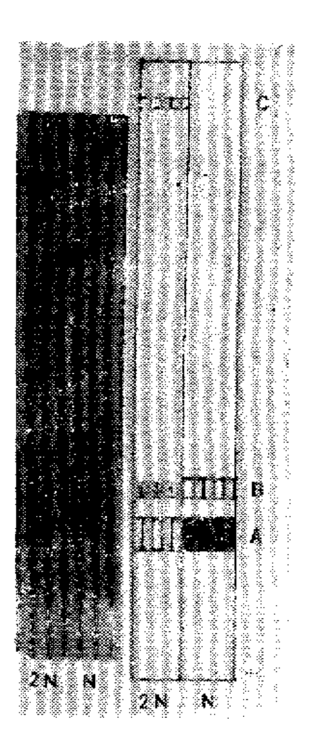


图 4　EST同工酶酶谱
2N为二倍体　N为单倍体

讨　论

上述实验结果系经过三次重复验证，由这些结果知道，泽蛙单倍体在鳃盖闭合期的几种同工酶新陈代谢，与同胚期二倍体个体比较很不正常。有的同工酶比同胚期二倍体的弱，如乳酸脱氢酶的同工酶。有的则比二倍体强，如酯酶的A、B带和苹果酸脱氢酶的D带。有的缺少了同胚期二倍体的酶带，如苹果酸脱氢酶的A带，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的A带和酯酶同工酶C带。有的新增了二倍体所没有的酶带，如苹果酸脱氢酶的B、C、E、F带和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的B、C带。这些实验结果是在个体水平上的比较得到的，而且是对同胚期（不是同时龄）而言，因而，可以说明，泽蛙单倍体的上述同工酶基因表达异常，有的本应表达的酶基因没有可检测的表达，有的不该表达的基因反而得以表达，有的则不正常地表达，以致造成酶产物不足或过多。由此可见，泽蛙单倍体由于缺少一套染色体组，基因表达不正常。这可能是造成泽蛙单倍体胚胎发育不正常，蝌蚪难以存活的主要原因。

参 考 文 献

丁汉波等　1965　十六种福建无尾两栖类杂交实验。福建师范学院学报　65—114。

北京大学生物系遗传学教研室 1983 遗传学实验方法和技术。高等教育出版社 272—275。

吴仲庆 1983 泽蛙雌核生殖单倍体产生过程的细胞学研究。动物学报 29(4):295—299。

吴仲庆 1984 泽蛙单倍体细胞RNA含量对胚胎发育和成活的影响。动物学报 30(2):108—113。

吴仲庆 1985 单套染色体组在泽蛙雌核单倍体发育中的作用。动物学报 31(1):28—33。

吴仲庆 1988 泽蛙雌核生殖单倍体发育中的核质关系。动物学研究 9(4):335—342。

Fankhauser, G. 1945 The effect of changes in chromosome number on amphibian development. *Quart. Rev. Biol.* 20:20—78.

Moore, J. A. 1955 Abnormal combinations of nuclear and cytoplasmic systems in frogs and toads. *Advance in Genet.* 7:139—182.

STUDY ON THE EXPRESSION OF SOME ISOZYME GENES OF GYNOGENETIC HAPLOID OF *RANA LIMNOCHRIS*

Wu Zhongqing

(*Aquaculture Department, Xiamen Fisheries College*)

The isozyme phenotypes of lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) and esterase (EST) between gynogenetic haploid and diploid of *Rana limnochris* were compared by polyacrylamide gel slab-electrophoresis. The results show that there are many differences in activities and bands between their corresponding isozymes. With these results, we are of the opinion that the abnormal expression of the isozyme genes of the haploid genome is due to lack of the interaction through another genome.

Key words: *Rana limnochris*, Gynogenetic haploid, Isozyme, Gene